

원저

뇌허혈시 청폐사간탕이 뇌혈류 및 산화질소에 미치는 영향에 대한 실험적 연구

김영석, 정우상, 박성욱, 문상관, 고창남, 조기호, 배형섭*, 이두익**

경희대학교 한의과대학 심계내과학 교실*, 경희대학교 의과대학 마취과학 교실**

An Experimental Study of Chungpyesagan-tang on Cerebral Blood Flow and Nitric Oxide in Cerebral Ischemia of Rat

Young Suk Kim, Woo Sang Jung, Seong Uk Park, Sang Kwan Moon, Chang Nam Go, Ki Ho Cho, Hyung Sup Bae, Kyung Sup Lee*, and Doo Ick Lee**

Department of Cardiovascular & Neurologic Diseases (Stroke Center), College of Oriental Medicine, Kyung Hee University*
Department of Anesthesiology, College of Medicine, Kyung Hee University**

Objectives: Chungpyesagan-tang is a famous oriental medicine treatment frequently used to stroke in Korea. The objective of this study is to evaluate the mechanism of the therapeutic effect of Chungpyesagan-tang on stroke in rat.

Methods: We compared the difference in regional cerebral blood flow, nitric oxide (NO) synthesis between the control and the Chungpyesagan-tang-treated group after ligating middle cerebral artery.

Results: In our study, cerebral blood flow increased more in the stroke rats which had been fed by Chungpyesagan-tang than in the control. Chungpyesagan-tang induced vascular NO synthesis, but had no effect on neuronal NO synthesis.

Conclusion: The mechanism of Chungpyesagan-tang's therapeutic effect on ischemic stroke could be explained by increasing cerebral blood flow and vascular NO synthesis.

Key Words: Chungpyesagan-tang, cerebral blood flow, nitric oxide (NO), stroke

서론

뇌졸중은 전 세계를 통하여 중요한 사망원인중의 하나이며 고연령 인구가 증가하면서 심장질환 및 악성 종양과 함께 성인의 3대 사인을 이루고 있다. 또한 일단 발병하면 생명을 위협할 수도 있으며 비가역적

인 신경학적 손상을 남기므로 이에 대한 치료 및 관리의 중요성이 그 어느 때보다도 증시되고 있다. 뇌경색은 뇌졸중중 뇌혈관이 막혀서 뇌세포가 허혈성 손상을 입는 것으로 이에 대해 서양의학에서는 혈전용해제인 urokinase, tissue plasminogen activator, 항응제인 heparin 등이 임상에서 널리 이용되고 있으나 부작용 발현으로 인하여 사용상에서 많은 한계에 봉착하고 있다. 한편 한의학에서는 이론적으로 많은 기존 醫書에서 중풍을 언급하고 있을 뿐만 아니라 임상적으로도 중풍치료에 대한 많은 경험이 축적되어 있어

교신저자: 정우상
주소: 서울시 동대문구 회기1동 경희대학교 부속한방병원 심계내과
전화: 02-958-9289 팩스: 02-958-9132
E-mail: WSJung@khu.ac.kr

사회적 신뢰와 함께 새로운 치료법으로서 기대를 모으고 있다. 특히 한방약물들이 합성약품보다 안전성이 높으며 부작용이 적다고 하는 점을 고려해 볼 때 한방약물로부터의 뇌졸중 치료약물 개발이 요청되고 있다.

청폐사간탕은 현재 한방에서 급성기 뇌졸중 치료에 빈용되고 있는 처방으로서 임상적으로 유의한 치료효과를 거두고 있으며 최근 항혈전 작용 등 그 치료기전에 대한 연구가 보고되고 있다^{1,2,3}. 일반적으로 뇌허혈 상태에서는 excitatory amino acids 가 활성화되고 산소 라디칼 (oxygen demand)의 생산으로 직접적인 neurotoxicity의 가중과 혈류부전에 의한 뇌 산소 공급/소모 균형이 깨져 뇌 신경세포의 비가역적 파괴의 악순환에 빠지게 된다^{4,5,6}. 산화질소(NO)는 뇌졸중의 예후에 지대한 영향을 미쳐 neuronal NO는 뇌허혈을 악화시키고 vascular NO는 허혈로부터 두뇌를 보호하는 작용을 하는데, 본 연구는 한의학에서 초기 뇌졸중 치료에 고 빈도로 활용되는 청폐사간탕의 NO 생산에 미치는 영향과 신경 세포와 혈관에 대한 차별성을 규명하여 그 치료 기전을 밝히고자 하였다.

실험방법

1. 실험재료

청폐사간탕에 약 5배 가량의 물을 넣어 2시간 끓여서 추출하고 여과한 다음 다시 5배 가량의 물을 넣어 재추출하였으며 이들 여액을 합하여 농축한 후 건조시켜 추출율을 얻었다(Table 1).

Table 1. Ingredient Composition of Chungpyesagan-tang

Herb	Latin name	Scientific name	Amount
葛 根	Radix Puerariae	Pueraria thunbergiana BENTH	16.0g
黃 芩	Radix Scutellariae	Scutellaria baikalensis GEORGI	8.0g
藁 本	Radix Ligustici Tenuissimae	Ligusticum tenuissimum KITAG	8.0g
蘿 卜 子	Semen Raphani	Raphanus sativus L	4.0g
桔 梗	Radix Platycodi	Platycodon grandiflorum JACQ	4.0g
升 麻	Rhizoma Cimicifugae	Cimicifuga heracleifolia KOM	4.0g
白 芷	Radix Angelicae Dahuricae	Angelica dahurica FISCH	4.0g
大 黃	Rhizoma Rhei	Rheum coreanum NAKAI	4.0g
Total amount			62.0g

2. 실험동물

300-450 g의 Long Evans rats을 사용하였고 三陽油 脂患料(柱)의 固形飼料로 물을 자유롭게 섭취할 수 있도록 하면서 24±2℃ 실험실 환경에 2주간 순응시키며 사육하였다.

3. 실험방법

1) 실험동물의 준비

실험동물들은 1.5% isoflurane과 air mixture로 마취하였다. 마취유지를 위한 혼합가스는 FiO2를 최소 25%를 유지하도록 산소를 공급하였다. 대상동물의 대퇴동맥과 정맥은 경색 크기를 측정하기 위해 이용되는 동물들을 제외하고는 polyethylene catheter를 삽관하였다. 두개온도는 heat lamp를 이용하여 36.5℃를 유지하였다. 체온은 servocontrolled heat lamp로 37℃를 유지하였다. 대퇴동맥 카테터는 심박동수와 혈압을 측정하기 위하여 Gould recorder에 부착된 Statham P23Db pressure transducer에 연결하였다. 이 카테터는 Radiometer blood gas analyzers (ABL 330 and OSM3)를 이용하여 PO₂, PCO₂, pH와 혈색소 농도를 얻는데 사용하였으며 심박동수, 혈압과 arterial blood sample을 측정하였다. 이와 같은 측정치는 MCA 결찰 후 한시간 경과시까지 지속적으로 측정하였다.

2) 중대뇌동맥 결찰

Unilateral middle cerebral artery (MCA) 결찰은 isoflurane 마취 하에 right parietal lobe 방향으로

구멍을 낸 후 노출하였다^{4,5,7,8}. 대상동물에게 국소적으로 약물의 투여가 되도록 MCA쪽으로 parietal cortex의 skull과 dura를 제거하고는 5X8 mm의 patch를 삽입하였다. 동맥은 가능하면 skull base에 가깝게 결찰하였다.

3) 측정항목

① Neuronal NO

NO synthase inhibitors인 selective neuronal NO synthase inhibitor인 7-nitro indazole (7-NI) 25 mg/kg을 MCA 결찰 후 15분에 복강으로 주입하였다. 또한 NO donors로서 artificial CSF solution에 10-3M의 sodium nitroprusside (SNP)나 molsidomine 유도체인 SIN-I로 soaked된 patch로 IC 또는 CC에 국소투여하였다. 대조군에서 상기와 같이 측정된 측정치는 MCA 결찰 후 한시간까지 시행하였다.

② Vascular NO

NO synthase inhibitors인 L-NAME 또는 L-NA (10-15 mg/kg IV)를 MCA 결찰 후 15분에 투여하였다. 또한 NO donors인 nitroprusside (3 mg/kg/hr) 이나 SIN-I(3 mg/kg/hr)을 경동맥내로 MCA 결찰 후 15분에 투여하였다. 대조군에서 상기와 같이 측정된 측정치를 MCA 결찰 후 한시간까지 측정하였다.

③ 국소 뇌혈류 측정 (regional cerebral blood flow: rCBF)

국소 뇌혈류는 Sakurada 등⁹)에 의해 변형된 방법인 14C-iodoantipyrine quantitative autoradiographic technique로 측정하였다. 간단하게 50 uCi14C-iodoantipyrine이 정맥으로 주입하였다. isotope이 venous circulation으로 주입되면, arterial catheter는 sampling catheter의 smearing을 최소화하기 위해서 20 mm에서 잘랐다. 20 microliter blood samples은 40 초동안 매3초마다 arterial catheter에서 채취하였다. 마지막 sample이 얻어지는 순간 decapitated하고 liquid N2에 frozen하였다. frozen동안 tissue sample은 4곳의 뇌부위, 즉 ischemic cortex, contralateral cortex, basal ganglion, pons에서 취하였다. 이 sample은

cryostat에서 20micrometer로 절편하였다. autoradiogram을 위해 5일 동안 X-ray cassettes에서 X-ray film (Kodak SB-5)에 expose해서 이런 sections을 준비하였다. cerebral 14C tissue concentrations는 computer-based microdensitometer system (Microcomp Image Analysis, Sothern Micro Instruments)로 측정하며 8 precalibrated standards (range, 40-1069 nCi/g, Amersham)에 참조하여 각각 X-ray film에서 측정하였다. 각각 측정될 brain region은 최소한 8개의 optical density measurements로 서로 다른 section으로 만들어졌다. blood sample은 tissue solubilizer에서 보관하고 24시간 후 counting fluid에서 보관하였다. 이런 samples들은 liquid scintillation counter에서 계측하였다. isotope count는 동시에 산출하였다.

④ 뇌동맥 및 정맥의 산소 포화도 측정 (SaO₂, SvO₂)

국소 뇌혈류를 측정하기 위해서 얻어지는 tissue sample의 또 다른 절편들이 동정맥 산소 포화도를 측정하기 위해서 사용되었다. N2 atmosphere하 -35℃하에 microtome-cryostat로 얻어진 20 micrometer 두께의 절편들은 미리 냉각된 glass slide로 옮겨 degassed silicone oil and coverslip으로 cover되었다. 이런 slides는 568,560 및 506 nanometer에서 optical densities을 얻을 수 있는 N2 충전으로 냉각된 microspectrophotometer에 놓여졌다. 이런 three-wavelength methods는 frozen blood에서 분산되는 light로 교정하였다. Transverse section된 혈관에서만 light가 blood를 통과하여 연구되었다. 판독은 이 부위에서 발견되어진 5개의 동맥과 8개의 정맥에서 산소 포화도를 측정하여 얻었다. 산소 추출 및 소모율 (O₂ extraction, O₂ supply, O₂ consumption, O₂ supply/consumption ratio)은 rCBF, SaO₂, SvO₂ Hb에서 산출하였다.

6) 자료계측과 통계분석

Blood의 oxygen content는 hemoglobin concentration X 1.36으로 oxygen saturation의 %로 산출하였다. 평균 동정맥 oxygen content 사이의 차이 (regional oxygen extraction)가 얻어진다. Fick principle을

이용하여 local oxygen extraction과 blood flow로 regional basis에서의 oxygen consumption을 결정하는데 이용되었다. Venous oxygen saturation의 variation coefficient (CV)는 heterogeneity의 변화를 비교하는데 이용되었다. CV는 (standard deviation/mean) X 100으로 산출하였다. Variance의 factorial analysis는 group과 cerebral blood flow, oxygen extraction, oxygen consumption을 측정하기 위한 여러 부위 사이의 차이를 판단하는데 이용되고 있다. 차이에 관한 통계적 의의는 Duncan's procedure를 이용하였다. Chi-square test는 venous oxygen saturation의 distribution을 비교하는데 이용하였다. 모든 경우에서 통계적인 의의는 P<0.05인 경우로 하였다.

결과

1) 청폐사간탕 투여군의 뇌혈류 및 산소소모량, 뇌 산소추출 변화

청폐사간탕군에서 뇌경색 유발 대뇌반구의 산소추출량은 감소되었으며 정맥 산소포화도는 대조군보다 유의하게 증가되었다(Table 2). 허혈대뇌의 대뇌혈류량 역시 청폐사간탕군에서 현저히 증가되었다(Fig. 1).

2) 청폐사간탕 투여군의 산화질소에 대한 영향

청폐사간탕의 뇌혈류 변화와 산소추출에 대한 작용을 길항하고자 청폐사간탕을 투여한 실험동물에서 중뇌동맥결찰 15분후 산화질소합성효소(NOS) 길항제, L-NAME (10mg/kg)를 정주한 NA군과 선택적 신경

Table 2. Cerebral Arterial and Venous Oxygen Saturations, Cerebral Oxygen Extraction and Oxygen Consumption 1 Hour after Middle Cerebral Artery Occlusion

	Ischemic Cortex		Contralateral Cortex	
	Saline	CPSG	Saline	CPSG
SaO ₂ (%)	96.0±1.2	95.6±1.1	96.0±0.9	95.4±0.8
SvO ₂ (%)	45.4±5.4*	51.4±2.8†	66.8±3.1	62.6±4.3
O ₂ Extraction (ml/100ml)	8.7±1.2*	7.9±1.0†	5.0±0.6	5.9±0.9
O ₂ Consumption (ml/min/100g)	8.7±5.8	11.8±3.1	11.6±3.1	14.3±4.6

*: p<0.05 vs CPSG group

†: p<0.05 vs contralateral cortex

CPSG: Chungpyesagan-tang group, SaO₂: Arterial O₂ saturation, Sv: Venous O₂ saturation.

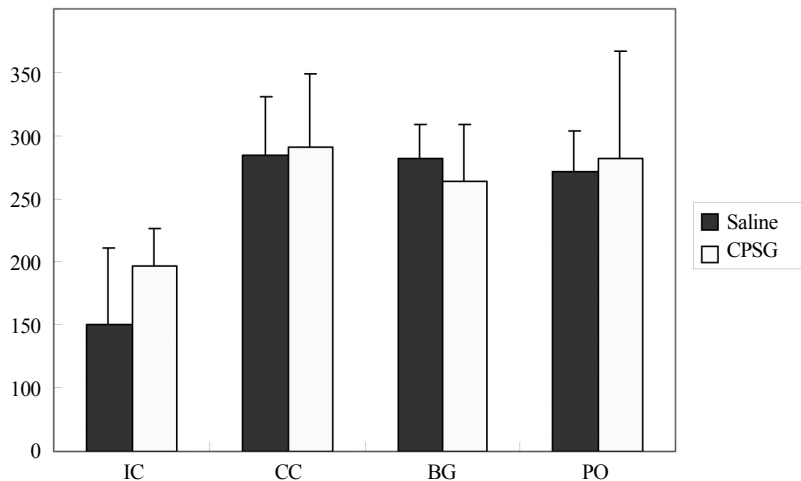


Fig. 1. Regional Cerebral Blood Flow in Saline and CPSG 1 hour after middle cerebral artery occlusion

세포 산화질소합성효소(neuronal NOS) 길항제, 7-nitro indazole(25mg/kg)을 복강내 투여한 NI군을 청폐사간탕군과 비교관찰한 바 Table 2와 같은 결과를 얻었다.

뇌혈류 변화에 있어서 증가된 청폐사간탕군의 혈류량(CBF)이 NOS 길항제 L-NAME를 투여한 NA군에서 현저한 감소를 보여 청폐사간탕의 작용이 억제되었음을 추정할 수 있었으나 선택적 neuronal NOS 길항제인 7-NI를 투여한 NI군에서는 차이를 볼 수 없었다. 뇌산소공급/소모율에 있어서도 NA군이 뇌혈류 감소에 따른 산소공급 감소로 청폐사간탕군에 비해 유의하게 낮아 산소균형이 악화되었으나 NI군에서는 유의한 차이를 볼 수 없었다 (Table 3).

고찰

본 실험에서 일측성 대뇌허혈 쥐에서 청폐사간탕에 의한 뇌혈류변화에서와 같이 허혈대뇌의 생리식염수군에 비해 청폐사간탕군의 혈류량이 현저하게 증가되었음을 보았고, 뇌산소추출 변화에서는 청폐사간탕이 생리식염수군에 비해 감소된 산소추출을 보여주었다. 산소소모량에 있어서는 반대로 청폐사간탕군이 생리식염수군에 비해 더 증가된 소모량을 보이나 통계학적인 유의성은 없었다. 이는 청폐사간탕군의 혈류량 증가에 따른 시간당 산소소모 총량의 증가에 따른 것으로 사료된다.

또한 청폐사간탕의 뇌허혈에 대한 종합적인 효과를 규명하기 위해 뇌혈류에 따른 산소공급의 변화와

뇌대사에 따른 산소소모의 변화에 대한 뇌산소 균형(산소공급/소모율)에서 반대측 비허혈대뇌에 비해 현저히 낮았으나 허혈 대뇌의 청폐사간탕군이 생리식염수군에 비해 유의하게 증가되어 개선된 상태를 관찰할 수 있어 청폐사간탕이 뇌허혈에서 뇌조직의 괴사를 줄여 허혈 뇌의 보호에 유효한 효과를 발휘할 수 있으며 이러한 효과는 뇌산소 소모의 감소에 따른 작용보다는 주로 뇌혈류 증진에 따른 산소공급 증가로 추론할 수 있었다. 그러나 뇌대사를 대변하는 산소추출(O₂ extraction)에 있어서는 청폐사간탕군의 산소추출량에 비해 NI군이 유의하게 감소되었는데, 이는 Table 1에서의 결과를 종합하여 볼 때 청폐사간탕의 작용에 대한 영향이 아니라 7-NI 자체의 neuronal NOS억제에 의한 뇌대사 감소에 기인한 것으로 사료된다.

청폐사간탕의 뇌허혈에 대한 치료효과를 알아보기 위하여 본 실험에서는 산화질소(NO)를 측정하였는데, 일반적으로 산화질소는 국소 산소 공급과 균형에 있어서 또한 뇌졸중의 회복에 있어서 매우 중요한 역할을 하고 있는 것으로 알려져 있다. NO가 두뇌에서 작용하는 target cell은 vascular cells, neuronal cells, astrocytes이며 vasorelaxation을 초래하고 혈관에서 platelet aggregation을 억제하며 허혈 동안에 excitatory amino acids와 free radicals의 neurotoxicity를 중재한다^{10,11}. NO에 의해 매개되는 다양한 기전들의 net effect는 target cell에서 NO의 intensity와 spatial differences에 달려있어 두뇌에서 산소공급과 소모를 유지시키기 위해 neuroal activity의 부위로 국소혈류를

Table 3. Cerebral Blood Flow, Oxygen Extraction and Oxygen Supply/Consumption Ration 1 Hour after Middle Cerebral Artery Occlusion

	Ischemic Cortex			Contralateral Cortex		
	CPSG	NA	NI	CPSG	NA	NI
CBF (ml/min/100g)	144.6±20.2*	102.0±14.4**	131.4±32.2*	240±56.6	202.6±44.4	226.4±61.4
SaO ₂ (%)	95.6±1.1	94.1±2.6	96.2±3.1	95.4±0.8	95.1±2.2	96.4±3.3
SvO ₂ (%)	51.4±2.8*	48.6±4.7*	57.4±8.6†	62.6±4.3	60.2±3.5	62.4±5.8
O ₂ Extraction (ml/100ml)	7.9±1.0*	7.2±2.1*	6.8±1.6†	5.9±0.9	6.0±0.8	6.2±1.8
Supply/Consumtion Ration	2,3±0.3*	1.8±0.1**	2.4±0.4*	8.0±0.5	2.8±0.4	3.1±0.6

*: P<0.05 vs Contralateral Cortex,

†: P<0.05 vs CPSG group

CPSG: Chungpyesagantang group, NA: CPSG + L-NAME group, NI: CPSG + 7-NI group

CBF: Cerebral Blood Flow, SaO₂: Arterial O₂ saturation, Sv: Venous O₂ saturation.

연결하는 역할을 한다^{12,13}). 허혈에 의한 신경 손상에서 NO 관련 약제들의 치료 이용도에 관한 최근의 연구는 매우 상반된 의견을 갖고 있는데 기존의 보고에 의하면 Neuronal NO production은 acute ischemic injury를 악화시킨다는 것^{4,5,6}) vascular NO는 middle cerebral artery (MCA) 결찰 후의 두뇌를 보호한다는 것이 규명되어 졌다^{14,15}). 그러나 non-specific NO synthase inhibitor로 알려진 NG-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME)가 MCA 결찰 후 허혈부위에서 뇌혈류가 감소되더라도 불구하고 산소의 공급 및 수요의 균형이 증가되었다는 보고가 있는 바^{16,17,18}), NO는 두뇌의 ischemic cortex에서 혈류나 산소의 공급을 유지하기 위해서 vascular system에는 좋은 효과를 나타내나 neuronal level에서는 metabolism을 증가시키는 excitoneurotoxin으로 작용하는 것으로 보여진다. 그러므로 ischemic induced neuronal damage에 NO의 역할이 논란이 있다는 것은 vascular site와 neuronal site를 비교하는 경우 서로 반대의 효과에 의한 것이라고 사료된다. 본 실험에서 NOS 길항제에 의해 청폐사간탕군의 뇌혈류가 현저한 감소를 보인 것을 고려할 때 청폐사간탕은 vascular NO 생성을 높이는 것으로 보이며, neuronal NOS 길항제에 의해 별 영향이 없었던 것으로 보아 neuronal NO의 생성에 미치는 효과는 없는 것으로 사료된다. 그러므로, 이상의 결과를 종합하여 볼 때 임상에서 뇌졸중 치료에 유용하게 사용되어 온 청폐사간탕이 뇌허혈시에 뇌산소균형을 개선시킬 수 있음을 알 수 있었으며 이러한 개선작용은 neuronal NO의 억제에 의한 뇌산소소모의 감소가 아니라 vascular NO활성에 의한 뇌혈류 증가에 따른 뇌산소공급의 증대작용임을 유추할 수 있었다.

따라서 임상에서 뇌졸중 치료에 유용하게 사용되어 온 청폐사간탕이 뇌허혈시에 뇌산소균형을 개선시킬 수 있음을 알 수 있었으며 이러한 개선작용은 neuronal NO의 억제에 의한 뇌산소소모의 감소가 아니라 vascular NO활성에 의한 뇌혈류 증가에 따른 뇌산소공급의 증대작용임이라 사료된다. 이와 같은 결과는 청폐사간탕의 약효기전을 해명하고 이를 바탕으로 한의학 및 약학에 종사하는 의료진이나 연구자들에게 유용한 과학적 근거를 제시할 수 있으며 이러한

연구방법을 이용하여 새로운 뇌졸중 한방치료제 개발에 기초적 자료를 얻을 수 있을 것으로 기대되어진다.

결론

청폐사간탕의 MCA 결찰 동물모형에서 뇌혈관과 뇌신경 세포에서의 산화질소의 생리적 효과들을 규명하기 위해서 NO생성, 국소 뇌혈류 변화, 동맥 및 정맥의 산소포화도 및 산소요구량을 측정된 결과 다음과 같은 결론을 얻을 수 있었다.

1. 허혈대뇌의 뇌혈류량이 청폐사간탕군에서 증가되었다.
2. 뇌산소추출결과상 청폐사간탕군에서 감소되었다.
3. 산소소모량이 청폐사간탕군에서 증가되었다.
4. Vascular NO를 억제하였을 때 청폐사간탕군의 뇌혈류가 현저한 감소를 보였다.
5. Neuronal NO를 억제했을 때는 유의성 있는 변화가 없었다.

이상의 결과를 종합하여 볼 때 임상에서 뇌졸중 치료에 유용하게 사용되어 온 청폐사간탕이 뇌허혈시에 뇌산소균형을 개선시킬 수 있음을 알 수 있었으며 이러한 개선작용은 neuronal NO의 억제에 의한 뇌산소소모의 감소가 아니라 vascular NO활성에 의한 뇌혈류 증가에 따른 뇌산소공급의 증대작용임을 알 수 있었다.

참고문헌

1. Choo MK, Park EK, Yoon HK, Kim DH. Antithrombotic and Antiallergic Activities of Daidzein, a Metabolite of Puerarin and Daidzin Produced by Human Intestinal Microflora. *Biol. Pharm. Bull.* 2002 (in press).
2. Kim JJ, Hae HS, Cho KH, Kim YS, Lee KS, Kim DH. The purgative action of Rhei Rhizoma

- is increased by Rhapani Semen in Chunpesa-gantang. *Nat. Prod. Sci.* 2000;6:161-4.
3. Park EK, Choo MK, Yoon HK, Kim DH. Antithrombotic and antiallergic activities of rhaponticin from Rhei Rhizoma are activated by human intestinal bacteria. *Arch. Pharm Res.* 2002 (in press).
 4. Chi OZ, Anwar M, Sinha AK, Weiss HR. Effects of MK-801 on cerebral regional oxygen consumption in focal cerebral ischemia in rats. *Brain Res.* 1991;69:414-20.
 5. Chi OZ, Anwar M, Sinha AK, Weiss HR. Effects of MK-801 on cerebral ischemia in rats. *Brain Res.* 1991;69:414-20.
 6. Nishizaki T, Okada Y. Effects of excitory amino acid on the oxygen consumption of hippocampal slices from the guinea pig. *Brain Res.* 1988; 452:11-20.
 7. Buchweitz-Mioton E, Weiss HR. Effect of middle cerebral artery occlusion on brain O₂ supply and consumption determined microspectrophotometrically. *Am J Physiol.* 1987;253:454-60.
 8. Tamura A, Graham DL, McCulloch J, Teasdale GM. Focal ischemia in the rat: Description of the technique and early neuropathological consequences following middle cerebral artery occlusion. *J Cereb Blood Flow Metab* 1981; 1:53-60.
 9. Sakurada O, Kennedy C, Jehle J, Brown JD, Carbin OL, Sokoloff L. Measurement of local cerebral blood flow with (14C)-iodoantipyrine. *Am J Physiol.* 1978;234:59-66
 10. Mellion BT, Ignarro LJ, Oshlstein EH, Pontecorvo EG, Hyman AL, Kadowitz PJ. Evidence for the inhibitory role of guanosine 3'5'-monophosphate in ADP-induced human platelet aggregation in the presence of nitric oxide and related vasodilators. *Blood.* 1981;57:946-55.
 11. Radomski MW, Palmer RMJ, Moncada S. The role of nitric oxide and cGMP in platelet adhesion to vascular endothelium. *Biochim Biophys Res Commun.* 1987;148:1482-9.
 12. Rees DD, Plamer RNJ, Schulz R, Hodson HF, Moncada S. Characterization of three inhibitors of endothelial nitric oxide synthase in vitro and in vivo. *Br J Pharmacol.* 1990;101:746-52.
 13. Tanaka K, Gotoh F, Gomi S, Takashima S, Mihara B, Shirai T. Inhibition of nitric oxide synthesis induces a significant reduction in local cerebral blood flow in the rat. *Neurosci Lett.* 1991;127:129-32.
 14. Nowicki JP, Dural D, Poinet H, Scotton B. Nitric oxide mediate neuronal death after focal cerebral ischemia in the mouse. *Eur J Pharmacol.* 1991;204:339-40.
 15. Yamamoto S, Golanov EV, Berger SB, Reis DJ. Inhibition of nitric oxide synthesis increases focal ischemic infarction in rat. *J Cereb Blood Flow Metab.* 1992;12:712-26.
 16. Morikawa E, Huang Z, Moskowitz MA. L-Arginine decrease infarct size caused by middle cerebral arterial occlusion in SHR. *Am J Physiol.* 1992;263:632-5.
 17. Nathan C. Nitric oxide as a secretory product of mammalian cells. *FASEB J.* 1992;6:3051-64.
 18. Shapira S, Brandeis R, Weissman BA, Kadar T. The effects of NO synthase inhibitor on brain ischemia in vivo. *Soc Neurosci Abs.* 1992;18:645.